

#16

EXTRUSION TECHNIQUES FOR PRODUCING LIPOSOMES

Publication number: JP61502452T

Publication date: 1986-10-30

Inventor:

Applicant:

Classification:

- International: A61K9/00; A61K9/10; A61K9/127; A61K9/133;
B01D61/14; B01J13/02; A61K9/00; A61K9/10;
A61K9/127; A61K9/133; B01D61/14; B01J13/02;
(IPC1-7): A61K9/10; B01D13/02

- European: A61K9/127P; B01D31/00

Application number: JP19850502838T 19850619

Priority number(s): US19940622502 19940620; US19840622690 19840620

Also published as:

WO8600238 (A1)
EP0185758 (A1)
ES8608922 (A)
EP0185758 (A4)
EP0185758 (A0)

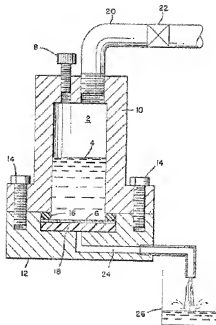
more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP61502452T

Abstract of corresponding document: WO8600238

Extrusion techniques for producing populations of liposomes having a substantially unimodal size distribution and for producing unilamellar liposomes. The unimodal size distribution is achieved by repeatedly passing previously formed liposomes through one or a plurality of filters, all of which have the same pore size. The unilamellar liposomes are produced by using a filter which has a pore size equal to or less than about 100 nm. In accordance with other aspects of the disclosure, liposomes are prepared directly from a lipid powder or pellet and buffer without the use of any solvents, detergents or other extraneous materials.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

◎ 日本国特許庁 (J P)

◎ 特許出願公表

◎ 公表特許公報 (A)

昭61-502452

◎ 公表 昭61年(1996)10月30日

Int. Cl. ⁴	発明番号	国内特許番号	審査請求	未請求	公開番号	2 (1)
B 61 D 13/02		2-8014-4D	予備審査請求	未請求	公開番号	
A 61 K 9/10	3 3 3	8742-4C				

(全 23 頁)

◎ 発明の名称 リボソームを製造するための押出技術

◎ 特 許 昭60-502638

◎ 特 許 昭60(1985)6月10日

◎ 特許文出日 昭61(1986)2月20日

◎ 特 許 出 願 PCT/US85/01161

◎ 特許公報番号 WO86/00238

◎ 特 許 公 報 日 昭61(1986)1月16日

◎ 発明者 佐々木 昭 昭61年8月20日(米国) (U S) 0022502

◎ 発 明 者 クリス、ピーター アール カナダ国 ブリティッシュ コロンビア ブイ6ジェイ 3アール 2、バンクーバー、ウォルナフット ストリート 1339

◎ 出 願 人 ギ リボソーム カンパニー アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08540 プリンストン、プリンストン フォレストルセンター、ワンリサーチウェイ (當地なし)

◎ 代 理 人 弁理士 八田 幹雄 外2名

◎ 特 定 記 号 A T (広域特許)、B E (広域特許)、C H (広域特許)、D E (広域特許)、D K、F R (広域特許)、G B (広域特許)、J、J T (広域特許)、J P、L U (広域特許)、N L (広域特許)、S E (広域特許)

最続頁に続く

◎ 特許内容に要約なし

特 許 要 約 要 約 要 約

1. 1000に等しいまたはそれより小さい少なくとも一つの孔を有するフィルターを通して圧力下にリボソームを移送し、移送されることによりリボソームの濃度のラメラ化の促進を成す。

2. リボソームの集団が2種より多くフィルターを通過させられるものである請求の範囲第1項に記載の方法。

3. フィルターが選択的透過特性を有するものである請求の範囲第1項に記載の方法。

4. フィルターがポリカーボネートフィルターである請求の範囲第3項に記載の方法。

5. ラメラ化が請求の範囲第1項の方法により促進されたリボソームの集団。

6. a) ラメラ化されたリボソームを回収し、そして

b) 戻りリボソームを1000に等しいまたはそれより小さな少なくとも一つの孔を有するフィルターを通して圧力下に移送し、移送させる、段階からなる実質的にユニラメラなリボソームの集団の調製方法。

7. リボソームが2種より多くフィルターを通過させられるものである請求の範囲第1項に記載の方法。

8. フィルターが選択的透過特性を有するものである請求の範囲第3項に記載の方法。

9. フィルターがポリカーボネートフィルターである請求

の範囲第4項に記載の方法。

10. 捕集量を増加させるためにリボソームを凍結乾燥サイクルにかけると同時に段階を有するものである請求の範囲第5項に記載の方法。

11. 請求の範囲第1項の方法により調製された実質的にユニラメラなリボソームの集団。

12. a) 回収物またはリボソームと水性緩衝液の混合物を回収し、そして

b) 凍結乾燥を1つのフィルターを通して低圧下に移送し、移送させる、

段階よりなる段階、段階またはその他の段階を含む物質を使用することのないリボソームの調製方法。

13. フィルターが選択的透過特性を有するものである請求の範囲第12項に記載の方法。

14. フィルターがポリカーボネートフィルターである請求の範囲第13項に記載の方法。

15. 捕集量を増加させるためにリボソームを凍結乾燥サイクルにかけると同時に段階を有するものである請求の範囲第12項に記載の方法。

16. フィルターが約1500より小さいかまたは等しい少なくとも一つの孔を有し、混合物は、このフィルターを2回より多く通過させられ、そして得られるリボソームが実質的にユニラメラなものである請求の範囲第12項に記載の方法。

特表昭61-502452(2)

特許(内容に限定なし)
明細書 図面

リボソームを形成するための抽出液

17. 請求の範囲第12項の方法により調製されたリボソーム。

18. 50nmより大きな平均直径について實質的に単一モードの分布を有するリボソームの集団。

19. 干渉光でのリボソームの集団の集積の装置の組のこの集団の試料により散乱された光の強度における時間依存変化の自己相関関数の集積が2次多項式によって極めて適合される程度である試料を収容する10用にて記録の装置。

20. すべてのものが同一の孔徑を有する1つまたは複数のフィルターを通過して、平均値について實質的に単一モードのリボソームの直径の分布を生じるのに十分な透過の調整リボソームを連続して通過させることであるリボソームの集団の均質性を増加させる方法。

発明の意義

1. 発明の名称

本発明は、リボソームに関するものであり、特に、ユニラメラリボソームの製造を製造および選別されたサイズ分布を有するリボソームの製造のための抽出液に関するものである。

2. 先行技術の概略

当該分野において公知のように、リボソームは、水性液体をとり込む隔壁二重膜を有する球形の小胞体(ベシクル)である。一般に、以下の3つのタイプのリボソーム、すなわち1) それぞれのベシクルが、2マニモの皮の配置のように一つの膜の内面に他の膜が収容された複数の同心二重膜を有するマルチラメラベシクル膜(MLV膜)、2) ベシクル1つあたりわずかに1つの二重膜を有しかつ約50nm以下の範囲にある直径を有するスモールユニラメラベシクル膜(SUV膜)および3) これらまたベシクル1つあたりわずかに1つの二重膜を有するものであるが、約70nm以上の、そして代表的には100nmおよびそれ以上の値である直径を有するラージユニラメラベシクル膜(LUV膜)が生産されている。

これらの装置および生成リボソームの様々な用途を調査する、これらの3つのタイプのリボソームに関する特許は、リボソーム2、マルク ジョイ オストロ、マーセル デッカー インコーポレーテッド、ニューヨーク、1993年 [Lipsomes, Marc J. Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1993] のテキストにおいてあることができ、これらの関連する部分、本特許書中に関連により組み入れられる。スゾ、ジョニア、ペンリア バイオアズ バイオテック、# 487 (1990年) [Szola, Jr., et al., Ann. Rev. Biophys. Biochem., # 487 (1980)] もまた参照すべきであり、これらの前述部分もまた、本特許書中に関連により組み入れられる。

尚ほしてまた他のタイプのリボソームには、安定なマルチラメラベシクル膜 [stable plurilamellar vesicles] (SPLV膜)、非脂ベシクル膜 [nonlipidic vesicles] (NPLV膜) およびステロイドリボソーム膜 [steroidal liposomes] である。これらのベシクル膜およびこれらの調製方法の説明は、同特許論文をとして一般に知られた、それぞれ1993年 3月24日、1993年 8月8日および1993年 8月12日に出版の米国特許出願一連番号 478,466号、第321,178号および第 599,691号にあることができ、そしてこれらの関連部分、本特許書中に関連により組み入れられる。リボソームの特別の使用の1つは、種々の薬理、栄養、薬理、化粧品、診断学的試験、生物学的活性化合物などの

ような特定の媒体としてである。リボソームはまた自然発生の生物学的膜システムの科学的モデルとして底層に用いられている。

これらの使用のそれぞれに関連して、限定された平均直径およびこの平均について限定されたサイズ分布を有するリボソームの有効な調製を有することが重要である。より賢明に、ある選択された平均直径について實質的に単一モードの [unimodal] 分布を有するリボソームの有効な集団を有することが重要である。

工業的用途および、特に薬理学的用途に關して、このような集団はリボソームに内蔵された薬品ないし荷物などの効果と安全性を高めるために必要とされる。さらに、リボソームの集団に内蔵された薬品の利用性は、食糧食品および薬品に取替可能 [the United States Food and Drug Administration regulatory agency] による政府機関からリボソーム含有製剤品に関する認可を得ることを容易に容易とする。経験的研究を包含するその他のリボソームの用途に關して、リボソームに等置けられた無機物の薬品を利用性は、より単純化された製造および低価格の他の実験を導くものとなる。

本発明は、リボソームの製造に関する改良された方法に関するものである。特に本発明は、1) ラージおよびスモールサイズのタイプのユニラメラリボソームを製造するための改良された方法、および2) 限定されたサイズ分布を

特表昭61-502452(3)

有するリボソームを製造するための改良された方法に関するものである。

本発明より以前は、ラブコニエラリボソーム属(Ｌリソ属)は、一般に以下の特徴のうち一つ以上によって製造されていた。すなわち種々の懸濁液を用いた(１)逆相凝集(inverse-phase coagulation)法、(２)洗淨希釈法(detergent dilution)法および(３)注入(infusion)法である。リボソーム、上記、第１号第37～44頁を参照のこと。

逆相凝集法においては、本発明係等が、「転化エス」(inverted nicotina)」、すなわち、リン脂質塩一層によって包膜されることにより荷重部膜中に空室化された水の膜を製造するために、リン脂質と荷重部膜の両方の中へ導入される。逆相凝集は、転化エスに配合して所望のリボソームを形成することとなる。例えばスゾル、ジュニア、アロウ、ナトル、アロウ、サイ、ユー、エス、エ (2:4194 (1970年)) [Suzuki, Jr., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 65B, 23 (1968)] およびババジョア・ウロス [Papadopoulos et al.]の米国特許第 4,235,871号を参照のこと。

洗淨希釈法アプローチにおいては、洗淨、洗淨剤および水溶液が先に混合されて所望のペナルを形成するために逆相凝集される。次に、洗淨剤を除去するために、ゲル濾過などのような分離技術が用いられしてこれによ

り完成されたリボソームを製造する。

注入法においては、経路は、逆相、例えばペンタシスあるいはポリエーテルに溶解され、そしてこの懸濁液を荷重部、細胞に溶解を促させる条件下で直接中へ注入し、そしてこれにより所望のリボソームを製造する。例えばデューマ、アナルス、ニューヨーク、アカデミー、オブ、サイエンス, 289: 2506 (1978年) [Beeper, Annals New York Academy of Sciences, 289: 2506-258 (1978)] を参照のこと。

Ｌリソ属を製造するために用いられているその他の技術は、融合(fusion)技術を含むしており、これらにおいてＬリソ属の膜面は、Ｌリソを形成するために膜々のＬリソにあまが適合することとなるように処理される。例えば、ビー、デメトリオス、ババハロア・ウロスに対する米国特許第 4,078,952号は、Ｌリソを逆相凝集リンダー中に混合するためにカルシウムイオンが用いられ、そして凝集リンダーが次に所望のＬリソを形成するためにＢＴＡなどのようなカルシウムレバー化剤で処理される技術を開示している。すくなくともした懸濁液を含有、Ｌリソ属の産生液滴がまた混合によってＬリソを製造するために用いられている。例えばユー、ビック、アーツ、ス、オブ、バイオケミストリー、アンド、バイオフィジクス, 212: 186 (1981年) [U. Pick, Archives of Biochemistry and Biophysics, 212: 186 (1981)] を参照のこと。

Ｌリソ属の製法に関しては、Ｌリソ属の製法と同様に、種々の技術が通常に用いられている。リボソーム、上記、第１号第37頁、第38頁を参照のこと。最も初期の技術は、アロウ製または荷重部膜凝集法を用いた水溶液中の膜の凝集法の高濃度の逆相凝集を含むものであった。他の技術は、通常としてエタノールを用いる以外はＬリソ属を製造するために用いられるラインに溶けた注入法(エス、バズビー、イー、コーン、バイオケミカル、アンド、バイオフィジクス, 289: 1915 (1973年)) [S. Katz et al. and E. Korn, Biochimica et Biophysica Acta, 233: 1915 (1972)]、および(2)、(3)のいずれの方法で得られたフレンチプレス(French press)を通してのＬリソ属の多量産物を用いた技術(例えば、ハミルトン、ジュニア、カ、リビッド、リサーチ, 21: 987 (1980年)) [Hamilton Jr., et al., Journal of Lipid Research, 21: 987 (1980)] およびペンネルズ、エフェー、ビ、ユス、レパト, 22: 219 (1979年) [Borenholz, et al., J. Eukaryot. Microbiol., 210 (1979)] を参照のこと。)を含むものである。

リボソームを製造するための基本的技術のほかに、種々の種々の技術がリボソームの産生を促進するために、リボソームの誘発剤として用いられ、発酵して産生する。特に、以下により詳しく説明されるように、上記に述べたＬリソ属の多くが、例えば一連のポリカ・ホネートフィルターなどを

用いる技術によって仕上げられたリボソームのサイズ範囲を制限するものであった。リボソーム、上記、第１号第37～39頁、第45頁およびスゾル、バイオケミカル、アンド、バイオフィジクス、アクト, 891: 595 (1980年) を参照のこと。一連のポリカ・ホネートフィルターは、Ｌリソ属のサイズ範囲をこれに用いられている。また、オズワルド、バイオケミカル、アンド、バイオフィジクス、アクト, 257: 9 (1979年) [Oswald, et al., Biochimica et Biophysica Acta, 551: 9 (1979)] およびホフワース、ジェニ、タル、オブ、アラマ、エ、ケミカル、サイエンス, 71: 806 (1982年) [Borenholz, et al., Journal of Physical Chemistry, 71: 806 (1982)] を参照のこと。

荷重部の技術のそれぞれが、リボソームを製造するために用いられる場合、これらの技術のいずれも全く満足のものではなかった。例えば、一般に用いられるＬリソ属の作製は、リボソームを形成する成分を溶解可能な濃度、すなわち、有膜脂質または洗淨剤のいずれかに混合することとなるものであった。当業界において公知であるように、脂質および洗淨剤は、リボソーム中に向うることが知られる。例えば洗淨剤のような、多くの物質に不利な影響を及ぼすものであり、そしてそれゆえこれらの技術はこれらの物質と共に用いることができない。また、脂質は細胞膜の一種などのような用途においては、これらの遺伝的機能性特定の存在の可能性は望ましくないのである。

特表昭61-502462 (5)

いには上限のゾーンが、リボゾムの置かれる均質な表面を画定しており、直接その隣2のゾーンの一部を埋り出すことなく生着し得るべきである。この長所は、セファロース4Bカラムの表面を形成するものであるが、これはまた長時間で投与であり、また5リリ程度の厚みしか製造できず、そしてまだ連続投与にふり起する困難を有している。これらと同じ特徴を備えて、ワツタ、*Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 1792 (1976) 及び *ibid.*, **18**, 212 (1977), **11**: 1792 (1976) は、直接懸濁の膜、40で10分間、1リリ、0.001Mで遠心分離することによってグリステイルホスファチルコリン (DMPC) から5リリ厚の均質な表面を製造することを報告している。

5リリ厚の均質な表面を得るための努力のほかに、よりラージなリボゾム、すなわち約0.9nmより大きな直径を用いるリボゾムの均質な表面を得るために数多くの努力がなされている。これらの努力の大多数は、前述される孔の一端のポリカーボネートフィルターの使用を基にであった。

例えば、オルソンら、*Biochim. Biophys. Acta*, **551**: 9 (1979年) [Olson, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **551**: 9 (1979)] は1.0、0.8、0.6、0.4および0.2ミクロンの孔径を有するポリカーボネートフィルターを通してのラージなリボゾムの均質的充填を述べている。アレ

ンセら、*Biochim. Biophys. Acta*, **505**: 129 (1980年) [Brandel, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **505**: 129 (1980)] を参照のこと。オルソンの研究はまた、産物純度により調整されたラージエタラリボゾムのサイズ調整後の均質の充填の適用を報告している。*Biochim. Biophys. Acta*, **501**: 359 (1980年) [Brandel, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **501**: 359 (1980)] も参照のこと。この場合においては、0.4、0.2、0.1および0.03ミクロンの孔径を有するフィルターが用いられている。

文献に報告されたようなオルソンの研究は、ラージリボゾムの単一モードの充填を達成するものと思われるが(例えば1979年論文の第1巻および第3巻、さらに1980年論文の第1巻、第2巻および第3巻を参照のこと)、下記実施例10において詳細に述べるように、サイズ分布を調整するための技術として単分散性微晶[*quasi-elastic light scattering*]が用いられた場合、オルソンの技術によって調整されたリボゾムは単一モードの分布を有していまいという結果となることが観察された。リボゾムの大規模な不均質の充填に際して、単分散性微晶は現在において、サイズ分布を電荷の同一の公称リアルタイム電荷的調整であり、それゆえ不均質の適用に関して、オルソンの製法は、単一モードであるリボゾムの表面を均質に製造するとはいい難いので

ある。

オルソンの近接的なポリカーボネートフィルターのアプローチの他に、見解的ラージなリボゾムの均質充填を得ることを希望して、その他の技術が試みられている。例えば、シュミット、*Chem. Abstr.*, **75**: 17979 (1975年) [Schmitt et al., *Chem. Abstr. and Phys. of Lipids*, **75**: 17979 (1975)] は、ラージなリボゾムをセファチルコリンリボゾムをサイズ調整するために、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0、2.0、1.0、0.5および0.2ミクロンの孔径を有するポリカーボネートフィルター[Millipore filter]の使用を述べている。

ローダら、*Biochim. Biophys. Acta*, **4173** (1979年) [Rhodes et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **4173** (1979)] は、コールゲナトリウム塩中にホスファチルコリンおよびコレステロールを安定化させ、そして次に中空糸透析によってその洗脱物を濃縮することから34〜128nmの間の距離を有するリボゾムの製造を報告している。このリボゾムのサイズは、リン脂質/コレステロール比ならびに透析液のpHおよびイオン濃度を調整することにより変えられた。より広い分布がよりラージなリボゾムに關してまじることが観察された。

ボスワース、*J. Pharm. Sci.*, **71**: 866 (1982年) [Bosworth, et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **71**: 866

(1982)] は、選択的ポリカーボネートフィルターサイズ調整技術と類似したタイプのフィルターの選択を組合せた。リボゾムは最終的均質または不均質なリボゾム、*Exponential*, **22**: 210 (1979年) [Barnes, et al., *Exponential*, **22**: 210 (1979)] のフレンジアレス技術によって調整された。膜の均質性によって調整されたものは、0.2〜1.0ミクロンの孔径を有するフィルターを用いて、リボゾムを最も小さなリボゾムで2段階調整させて、そしてある場合には、フィルターのそれぞれ2段階調整させて、サイズ調整された。報告に關しては、0.05〜0.3ミクロンの孔径を有するフィルターが用いられた。エノクラ、*Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**: 148 (1979年) [Enoch, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**: 148 (1979)] は、産物調整されたベクトルの洗脱およびその後のセファロース4Bカラムにおける均質充填によって1.0〜0.05nmの距離を有するリボゾムの製造を述べている。ハミルトン、*J. Cell. Physiol.*, **21**: 981 (1980年) [Hamilton, et al., *Journal of Cell Physiology*, **21**: 981 (1980)] は、組織心分離および2%と4%アロースのカラムにおけるグルコマトグラフィーと組合せてフレンジアレスを用いて様々なサイズのリボゾム単位の均質を述べている。レーブス、*J. Cell. Physiol.*, **73**: 49 (1969年) [Reeves et al., *J. Cell. Physiol.*, **73**: 49

特許昭61-502452 (6)

(1969) は10p 正規分布を有する巨大リボソーム(モード=1, 200nm)の周囲の調製を推定しているが、1.000nmより小さなベクトルはかろうじて調製され、そして0.000nmより小さなものにいたっては全く測定されなかった。

前述の製法は、いくつかの海軍艦中、スペイン、アン・レ
ア・バグワース、ハイゼンゲル、など： 467,489-
490（1950年） [S200, 41, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496,
497, 500]； 467,483-49d（1980）] に於いて見ることができ
る。リッソールム、マルク ジェイ・オストロフ、マー
ス・ダーク・インコーポレーテッド、ニューヨーク、
1983年、領土録 [Licenses, Marc de Cytra, ed., Marcus
Denker, Inc., New York, 1983, Chapter 1] も余命の
こと。

疼痛の軽減

当分野の前途の状況において、SUⅢおよびLUⅢタイプの両方のユニラメラリボソームの構築に關する改良された方法の実質的かつ継続された必要性があつたことは明確である。

さらに、少なくとも早くも1969年以降、想定されにサイ
ズ分布を有するリボソームの熱図を製造するための蒸餾
された努力があることもまた明瞭である。これらの努力の多
くは、約60のnmより大きな平均温度を有する熱図を得よう
とするものであった。蒸餾液に関する適切な処理法と共に

広い種類の製造条件に関して使われる、線タイプの集束を再現性よく生成する技術を採用することを一般的に適用できつつ簡単にできる進行的な既知があった。

従つて、ユスラメラガバアボム製造に關する政府の取
扱は極めて堅固なことが本発明の目的の一つである。より
詳しくは、平直な手に入れたものがきつた比較的安全な状態
で進行することができ、最小限の摩擦を生じ、早期の均
衡リソルブメントを誘致し得るを得、そしてリソルブメン
トを成す物質を露出させるを得し、尚ほ、洗淨すること
が極めて容易な関係にも拘らず輸送せよることと必要となしめ
ユスラメラガバアボムの製造に際する利便性、資源性の
一特徴を構成することが、本發明の目的の一つである。

溶剤、洗淨剤もしくはその他の蒸気源は危険な物質の使用を必要としないユニメラおよびマルチメラの両方のタイプのリポソームを製造する技術を提供することが、本発明の別個の目的である。

指定されたサイズ分布を有するポリソームの集団を溶解することが本発明のさらに別の目的である。このような集団を得るための簡便な方法を提供することが本発明のまた別の目的である。

上述のおよびその他の目的を達成するために、本発明は本発明のいくつかの実施によると、予め形成されたリボゾームの、通常の上膜以下、特に約100Å以下の孔徑を有するフィルターを通しての中膜上で定着された構造を示す。

含む実験的にユニラメラなリボソームの集団を製造する方法を提出するものである。

このように、下記説明は、エニウラキリボソムを製造する
 各段のシステムより以上に、以下の例、すなわち、1
 広帯域の超短波よりエニウラキリボソムを生成する能力、
 2) 高圧放電を容易に達成するように高圧高周波（例えば
 300000V/1000000Hz）を生成する能力、3) 自然
 的に高出力およびよりフィルターを透過するリボソムの割合
 を増加し同等程度の流れを生ず、エニウラキリボソム、
 特にラジエエニウラキリボソムの消費量の少ないで無害に
 迅速な高圧を達成する能力、4) フィルターの置き換えを
 最小限化しての第一高圧フィルターの使用による過度な
 熱の放射のリボソムを製造する能力、5) 高圧源および
 高周波源の使用をなくする能力、および6) 増進しかなり強
 なプロセスを提供する能力を含むいくつかの特徴を有する
 ものとある。

いくつかの態合においては、マルチメラリボソムの集団を實質的にユニメラリボソムの集団に完全に変化するよりも、完全にユニメラの複製まで送ることを、該集団のラチシティ (laticity) を単に部分的に減じることが望まれる。物 1/1000 の乳送を有するフィルターが、本発明のこの発想によりなお採用されるが、フィルターを通る溶液は減じられる。

本発明の他の恩恵のいくつがによると、本発明は、図8

研究手法は、アンケートを社会経済調査と別に実施し、そして次に階層・属性別混合モデルをフィッティングを通して階層別・属性別に適合したモデルを構築・検証することで十分なる検証を行うことにより、階層別属性別結果またはバリエーションリソースを製造する方法を見出すものである。フィッティングが約100回以上ある各属性をそれぞれでフィッティングし、実質的にユニークなバリエーションを製造する。フィッティング約1000回より程度に過ぎない。例えば200回のオーダーがある属性は必ず対応できないと、マルチメディアリソースが関係する。異なる場合と、いずれの場合においても、リソースは適切な配分を必要とする限りであり、それゆえ、MLLを製造するために用途において使用されてきたような、クロムクロム、本発明のこれらの発見によりリソースの製造に必要とされる。

本発明のさらに別の見地によると、本発明は5000より大きな平均電位差にわたり本質的に単一モードの分布を有するリボンソームの導管を提供するものである。

本発明のまたさらに別の見地によると、本発明は、リボソームの特定のサイズを前記本質的に単一モード性となるまで一定孔径のないしそれ以上のフィルターを通してリボソームを捕獲して選別させることによるリボソームの特定の成分を分離する方法を提供するものである。

本発明に係る前述の要及びその他の点の目的ならびに利点の
説明は、本発明の好ましい実施形態図によって以下に示

特開昭61-502452(B)

を製造する手段技法を要するものである。さらに、本発明は、素子、及び用いるべきその他の超伝導材料等を成形するに必要と製造されること（以下、本発明の「超導特性」の発現と呼称する。）をリボソームに評価するものである。

実質的にユニフォーマリボソームは、予め形成されたリボソームを、約100nmより小さい幅の間に等しい大きさの孔を有するフィルターを通して中間圧での超伝導相転出におけることにより製造される。

予め形成されたリボソームは、種々の組成を有することができる。またリボソームを製造することに関し何とを公知のあるいはこれに就いて既述する技術のいずれによっても製造されることがある。

例えば、予め形成されたリボソームは、MgLiを基質とする公衆の炭素、すなわち、溶解された1ないしそれ以上の層をクロロホルムに溶解し次にクロロホルムを蒸発させることで適当な容積の容器上に凍結された1ないしそれ以上の膜を形成する。内包されるべき水素源を基質に追加し、断片を水化することによって水素源に近接し、そして、所望のリボソームを製造するために、凍結した超伝導相転出を凍結するに製造することにより形成されることがある。この技法は、リボソームの製造に際して高圧下において未知な最も良質な容積をうむに最も単純な装置および手順を用いるものである。またこの技法は上記に論議された、超伝導相転出の発現場所、層（クロロホルム以外）また

はその他の超伝導物質の発現での相転出等になくすものである。

あるいはまた、本発明の超伝導の見地に於いて、フィルターを通して筛选し和流されるべきリボソームは、単に超伝導相転出のベレットを投資型といふべき組合せで、そして次に、直接、この混合物をフィルターを通して筛选することにより製造される。フィルターが約100nmより小さい孔を有していること、この製造は、ユニフォーマリボソームを製造し、一方実質的に100nmより大きい孔を有すると、マルチメラベシクルを形成する。いずれの場合においてもこの製造は、クロロホルムを含むすべての溶媒の使用をなくすものである。

実質的に単一モードの分岐を有するリボソームの製造の製造に際して、超伝導を形成するリボソームは、種々の組成を有することができ、また現在公知のあるいは既述するマルチメラベシクル、ユニフォーマリもしくはその他の種のタイプのリボソーム、あるいはより一般的に超伝導を有する超伝導の材料である。例えば超伝導超伝導は、同様に製造されて一超伝導とされそれそれ1983年3月24日、1983年8月8日、1984年3月29日、および1984年4月22日出版された米国特許出願一連番号第476,496号、第521,176号、第559,591号及び第599,591号に開示されている。その超伝導部分は関連により本明細書に転入される。1)タイプのスロイドリボソーム、安定なアルファメラリボソーム（SLP

LV）、マルチメラベシクル（MLPV）あるいは超伝導マトリクスキャリアー（MLVC）の形態であり得る。

超伝導の平均直径は、リボソームが包み込まれるべき環境に依存する。例えば、当業者によって認識されているように、超伝導の平均直径に際しては、100nm〜500nmの範囲の平均直径が通常得られ、一方、超伝導の平均直径は、より大きな直径、例えば500nm〜1000nmの範囲が好ましく、そして超伝導の平均直径が望まれる範囲に際しては、より小さな直径、例えば50nm〜100nmの範囲が好ましい。その他の超伝導に際しては同様の範囲が好ましく、この範囲を有している。例えば、リボソームは、上記を参照のこと。

リボソームの表面の平均直径は、アライズフラクチャーおよび超伝導性発現を含む、当分野で公知の種々の技法によって評価されることがある。上記に基づいた以下にさらに詳述するようには、超伝導性発現は、本発明の単一モードの発現の製造において好ましく、そしてこれらの発現に関連して本明細書中に開示されるリボソーム超伝導の超伝導、この超伝導を用いて評価されるものである。

リボソームの実質的に単一モードの表面は、予め形成されたリボソームを、超伝導のサイズ分布が実際に単一モードとなるまで一定孔径のフィルターを通して凍結し凍結させることにより製造される。一定孔径のフィルターを通しての凍結し凍結は、リボソームの超伝導のサイズ分布の及

超伝導（単一モード）の超伝導、をよりより深いモードの超伝導、結果的に消失することを防ぐものであることが驚くべきことに現れている。しかしながら、設定方法に際しては、1つの孔径を適用しかつその超伝導に使用することが好ましいである。

予め形成されたリボソームは、リボソームの製造に際して現在公知のあるいはこれに就いて既述する技術のいずれによっても製造されることがある。例えば、予め形成されたリボソームは、上述した、マルチメラベシクル（MLVC）の超伝導のための、超伝導の超伝導により形成されることがある。

あるいはまた、超伝導超伝導、侵入し、および超伝導超伝導などのような、ラージユニフォーマリボソーム（LUV）を製造するために用いられる技法が、予め形成されたリボソームを製造するために用いられる。リボソームを製造するためのこれらの好ましくその他の超伝導の超伝導は、リボソームは、上記、中に開示することができ、その超伝導部分は、関連により本明細書中に開示される。さらにまた、予め形成されたリボソームは、上記の米国特許出願一連番号第476,496号、第521,176号、および第559,591号に開示される超伝導の超伝導に開示されることがある。また、リボソームそれ自身を製造するより好ましく、上記の米国特許出願一連番号第476,496号に開示されるものより好ましく、超伝導の超伝導が、超伝導の超伝導において用いられる。このよう

特表昭61-502452 (9)

な場合、得られる唯一ソードの集団は、決して、リボソームの集団というよりむしろかと言え用いられる最初の非結合おろきの集団と同様な特性を有する集団である。

予め形成されたリボソームを製造する技術の選択においては、用一モードの無菌性を高めるために選択される技術は、例えば、有菌に小さな産物を与えるリボソームの汚染の可能性を生み出すことのないものを選択することが重要である。また、例えば、用一モードの無菌性で海外からリボソームを供給するためにはフィルトレーションを通じて無菌に保つ必要がある。また、例えば、用一モードの無菌性を高めるために、リボソームの汚染に耐えるタイプと汚染に比較的に敏感に決定できるゆえに、この製法を決定する技術を選択することは、最終において適切になれるものである。

ヒ素桿桿として予め形成されたリボゾームを閉じる態にも
 可能であるならば、リボゾームの實質的に単一モード
 の状態は、上記した経済的プロセスを省いて形成される
 ことである。すなわち、リボゾームの形成過程、膨張前
 状態はレプリカトおよびリボゾームの形成に、これらの成
 分をいっしょに融合して次に膨張過程を直接経ることに
 したに似て、リボゾームを閉じる過程は、膨張前モード状
 態をその十分な膨張過程を省くことにより、形成される
 ことである。

ユニラメラリボソームあるいはリボソームの型一モードの分離を生起するために用いられるフィルターは、鮮まし

は途端に透気漏れ（straight through channel）を有するタイプのものである。スクリュー インコーポレーター、プラザント、カスケディアス®（LucasDyne, Inc.）[0005160]、[0] による製造法はこのタイプのポリマーポスターフィッラー、本発明の装置において容易に生産することが見出された。代表的な製造法において、このフィッラーは樹脂マトリによりポリゾーム構造の最初の 2 ないし 3 層の塗布に供給しなければならない。樹脂マトリは通常、熱硬化性、粘着および潤滑性のような機能を担いながら用いられる圧力および温度に依存する。

本発明によるユニラメラリポソームの調製においては、同様のフィッラーマトリ、フィッラーの液滴のサイズである。例えばフィッラーの液滴が通常に約 100 nm である。通常はマトリに混合する 2 層のマトリであるとする、MLV をさらに多くの段階のユニラメラリポソームへ透過させる。カスケディアス®によるユニラメラリポソームを製造することとは等しいという点を見出し（下記実施例を参照）、本発明の（2）に従って、約 100 nm に近いかまたはそれより小さな孔徑を有するフィッラーのみが、本発明のこの目的に最も適当であると見出された。

以下の実施例において例示するように、製造されたユニラメラリボソームのサイズは用いられたフィルターの孔径に依存し、通常平均直径は孔径よりも小さなものとなる。もし両端されるならば、リボソームの単位直径は、その濾

葉の長さ (leaved volume) (ラフ面積 [leaf area] 値の 0.44 と面積に、上記に述べた距離積率を用いて等倍に増強したことが可能である (下記図表参照) であることは、おぼろげのこと。)。厳密なことは、この方法は、産地、採集された果のその日摘採後に旬割の使用を完全に行なうものであるが、リアルタイムでサイズを把握するためには、明後日及び翌日の雨湿を予測しなくては行なわれる。ペシクルのサイズおよび摘採密度は、品質保証に必要となるような数のパラメータを度量するものとして作成することとされる。

所されるニラマリアンソームと相対するものに吾等と
 思われるフタル酸を通しての造るの取扱は、フィルムと
 漆（乳脂、樹脂および糖類）およびニラマリアンソームが厚皮を
 形成しに依存する。下の実例からよく示す例であるように
 この二種はそれぞれ100%のニラマリアンソームをフタル酸
 を通しての四酸化とはそれ以上の濃度は、ニラマリアンソ
 ームを潤滑した後に代換物に必要とするものである。より
 少ない濃度はより少ない量に必要とされるであろう。例え
 ば3.0のニラマリアンソームでは、2-4個の過炭が、実地的
 にニラマリアンソームの反応が進行するに
 必要十分のものである。4個の過炭を8を必要とする。こ
 のため、次に我々のフタル酸を通する目的である
 は、実例からニラマリアンソームを通するものより少ない濃
 度である。そのより少ない濃度の系に於ける過炭の過
 量な性質は、より低濃度のニラマリアンソームが過炭をより

決定するために単に世に上げられたりボソームをサンプリングすることによって選抜者により世局に決定される。

水田用のササゲモードの圃場を例にして、フルタイムの連作による、農産物の栄養分の平均値に關して決定度である。通常約15~20%の範囲内で、平均値はほぼ等しいものである。しかしながら、約10%より小さい差は、圃場に関しては、該圃場の平均値は、より小さい値に對して、比較にかなうが、平均値は急激に上昇して約75%を安定した値に到達する。上記に述べたように、約10%より小さい差に對しては、上記に及ばずより高濃度は、最初の圃場の圃場にはみならず、その後の圃場にも見られることが判明する。10%程度の大きな差に對しては、マルプラズマライオンにマルプラズマをとりまきユニニマルプラズマはユニニマルプラズマである。

実質的に同一モードの共振を製造するために必要とされる波長 λ を透過しての透過波長は、フィルター特性は物質、組成および厚みによりおのづから決定されるものとして依存する。ある場合には、2つの係数とされるポリカーボネートフィルターを通しての3〜5層の透過は、同一モードの分布を製造するのに十分なものである。一般的に、2層と、2層波長おそれたポリカーボネートフィルターを通しての2層の透過は、ほとんどポリソソム輪状物において所望した同一モードの分布を製造するものである。このような輪状物に結合するポリソソム輪状物に結合する

図表61-502452 (11)

途中へは入れられる。蓋も形もよく、これは装置／排出管 17 に、短い長さの可塑性の袋と袋下排水器を接続することによりなされる。

いったん装置 3 から燃料が完全に燃焼されれば、燃料バルブ 27 を閉じ下げることにより燃料は圧力室 28 へ移される。さてここで燃料は、バルブ 6 を通じての排出し率が増えたとのっている。即ちこれを行うために、圧力／透過バルブ 23 は、ガス入口 31 から圧力口 33 まで一瞬間に閉鎖するまで閉ざされ、そして装置／排出管／燃料バルブ 15 は、該バルブ 15 内に形成された真空開口 37 が一方の端部において入口 19 とまた他方の端部においてバルブ 23 までと一直線上に開通する状態にまわされる。ガス入口 31 は、その状態をバルブを閉めたままレギュレーターを備えた外部の高圧ガス源、例えばバルブを備えたレギュレーターを備えた高圧空気タンク（図示せず）に接続することにより充填された開口 33 に接続される。

圧力がまた圧力室 28 へ増えれば、燃料が、フィルター 5、バルブ 4 から、排出管 17 から再び入口 19 を通ってこの室から装置 3 へと送進することが起こる。これは、フィルターを通しての燃料の 1 回の排出し率を増すものである。圧力室 28 から装置 3 への流は、アレキサンダーハウジングを通して目標値を超過することができ、そして適用される圧力は、燃料を送進するために調整される。

いったん燃料の全てが装置 3 に移されたならば、外部の

圧力室上のバルブは閉じられ、また圧力／透過バルブ 23 は、最初に透過口 25 から出口 21 と一直線上に開通するように、そして次に圧力口 33 と一直線上に閉鎖するようにまわされ、これによって装置 3 および圧力室 28 の燃料の循環がなされる。さて燃料は、燃料バルブを再び押し下げることにより、圧力室 28 へ移入される。圧力室 28 中の燃料にて、排出プロセスは、上記に燃料の排出し率に対して述べた手順に似て繰り返される。燃料が装置にある限り及び両方の室が送進された際に、同様ならば、上記に述べたような手順に従って新しいフィルターを適用することができる。

装置－低圧腔－装置インテグレーションは機械的送られたならば、燃料は、燃料がガス入口 31 を出口 21 に、また燃料／排出管 17 から入口 19 に一直線上に閉鎖させ、次に圧力を外部の圧力室から系に与えることによって、燃料／排出管 17 を通じて装置より排出される。実施において、給油の終わりに対する高いガス圧をなくすために、外圧は、すべての燃料が室 33 よりも出てしまう前に止められる。装置／排出管 17 を用いるほかにも、アルミニウムハウジング 7 から燃料が送られたターナー 18 は、フィルター 5 を支持ハウジング 9 をよりリング 16 を取りはずし、そして次にサンプルが圧力室中にさらに燃料の送進の時に用いられるように燃料バルブ 27 を押し下げることにより、燃料はまた送進されることがある。

前述の如く、図 11 図に示される装置あるいは同等の装置は、完全に自動化されたプロセスを導くことができる。また、燃料の燃焼を用いた燃料のガス－液体相の燃焼速度に比例するよう、用いられる圧力の圧力室も、ウェービング・システムあるいは燃料の燃焼を用いて加熱をなすことができる。

ある燃料に燃焼することと燃焼することなく、本発明は以下の実施例によりさらに詳細に述べられる。以下に述べられる種々の実施例に共通する物質と方法とは以下の通りである。

物質と方法

装置

非ホスファチルコリン（EPC）および大分子ホスファチルコリン（SPC）は標準的装置（シングルトン、フローナル、サー、アメリカン、オイル、ケミカル、ソサエティ、22: 53 (1965)）（Singleton, et al., *Journal of American Oil Chemical Society*, 42: 53 (1965)）を用いて製造された。相対する種類のホスファチルコリン・アルコールアミン（PE）およびホスファチルセリン（PS）は EPC および SPC から得られ、ホスファチルコリン・アルコールアミン（EPE）、大分子ホスファチルコリン・アルコールアミン（SPE）、ホスファチルセリン（EPS）および大分子ホスファチルセリン（SPS）は調製された

（コンピュータ、ピー、とテアル、アール、エフ、エ（1977年）*バイオケミカル、エド、バイオフィジック、アク*、448: 36-42; Oenferius, P. and Zsuzi, A. F. (1977) *Principles, Biochem., Acta*, 448: 36-42）を参照のこと。）。大分子からの物質は、SPC 中の高い分子量の割合によって、EPC から得られたものと比べてかなりより不純物なものであった。（*テルコック、ピー、エス、とユーリス、ピー、アール、*（1981年）*バイオケミカル、エド、バイオフィジック、アク*、449: 169-291 [Tilcock, C. P. and Oulie, P. (1981) *Biochem. Biophys. Acta*, 643: 169-201]）を参照のこと。）。すべての物質は、厚層クロマトグラフィー（TLC）により測定される純度 99% 以上であった。酸性リン脂質（PS）は、ホア、エム、シェイ、とキユーリス、ピー、アール、（1980年）*バイオケミカル、バイオフィジック、アク*、448: 446-452 [Hoad, E. M., and C. Ullie, P. R. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92: 446-452] に述べられるようなトリオールの形態へ修飾された。コレステロール（シグマ、セントラル・シグマ、St. Louis）はさらに精製することなく用いられた。

装置と材料

燃料容器（Trapped volume）を測定するために、22.6 mm には¹⁴C-イソリス（エヌイーエヌ、カナダ、NEN Canada）1 μCi の存在下にある以外は、下記実施例

特許第61-502452(13)

当分形において共通であるように、1) 曲線図関数の曲線図関数を求めること、2) 2次元項式を曲線図関数に適合すること、および3) この多項式のこの数値への適合度の良好さを求めることは簡単な事である。従ってガウス分布アプローチは、近接ベクトルの範囲を調整してして反復するに最も実用的な方法であり、そしてそれゆえ、本発明の準モードの発現に関連して本発明書中に用いられるアプローチである。

特に、これらの見地によると、リボソームの構造は、その曲線図関数の実装が2次元項式に極めて一致する点から、実質的に「準モード性」であると暗示される。以下に示される実用例において、曲線図関数値は、ニコシア モデル 200 レザー パーティクル サイバー [Nico no Model 200 Laser Particle Sizer (ニコシア インストルメント インコーポレーテッド、サンタ バーバラ、カリフォルニア州 [Nico no Instruments, Inc., Santa Barbara, California])] を用いて得られた。この装置は、液体を含むための最小2個の標準的方法を備え、曲線図関数と2次元項式により定義された値との間の誤差から算出された χ^2 としての適合性の良好性を無視するものである。0~2の範囲の χ^2 値は通常準モードガウス分布によるデータの良好な適合性を示すものであり、一方、 χ^2 の高い値は、良い適合性を示すものである。

良好な適合性に関して、月々の標準偏差の誤差は、数多

項式の2次元項の数値の二乗根から算出される。良好な適合性を有する分布に関して、この数値は通常値において算出され、一方、新しい適合性に関しては、数値の値は算出されるが、このような値は実際に標準偏差の誤差と与えあことができないので誤解は招き得る。

その他の装置

イミラン、造りの良、準-型に属するトリウム、チタニウム、0~25セファテックス [0-25 Sephadex]、シアノ水酸化水素ナトリウム、水素を収めるナトリウムおよびコレステロールは、シグマ (Sigma) から得られた。ワルトロゲル A034 [Waltropal A03] はアラマシア [Pharmacia] から得られ、チアラフリン-Na 125 [10005] (ノル) はアメルサス [Amersham] により供給されそしてアイソダグ [Isodag] はペルス [Piscope] から得られた。その他の化学品のすべては分析純のものであった。

実験例

ユニラメラリボソームの製造

この実用例は、本発明の原理性を示すラウツエラメラベクトルの製造を明示するものである。量及の容易化のために、この方法に従って調整されたリボソームは、以下、標準 [LUBET]、すなわち抽出法によるラウツエラメラベクトル [LARGE Ultralateral Vesicles by Extrusion Techniques] と呼ばれる。

ラウツエラメラベクトル (LUV) は、以下のような典型的プロセスによって調製された。最初、クロロホルム中に溶解された脂質が、攪拌されて凝縮膜の内側のフィルムとして添加された。LUVは次に、単に100mM NaCl、200mM HEPES、pH7、その水性緩衝液を調整を加え、撹拌混合により調整を完了することにより形成された。

得られたLUV分画は(2~10%)は、次に100mM 乳剤を有する2つ機械化された膜と50mMリボソームフィルター [スクレバ、インコーポレーテッド、プレザント、カリフォルニア州、カタログ番号110068 (Sclerob, Inc., Pleasanton, California, Catalog #110068)] を備えた、第1A図に示した装置の圧力腔中へ移された。脂質圧が低下(0~400psi) レギュレーターを前記に標準ガスシリンダーを介して減圧へかけられた。ベクトルは通常20~80%分となる100~700psiの圧力を用いてフィルターを通して抽出され、そして集められて再投入された。前記手洗ひをしない以上、この直流の経路は、フリーズフラクチャーにより好適して約70mMの塩度を有するラウツエラメラリボソームの抽出をもたらすものであった。前記濃度を含有抽出プロセスで、15分ないしそれ以下かかるものであった。

以下の実用例は、抽出装置により調整されたリボソームにおけるサイズ、ユニラメラ性、脂質含量、脂質組成およ

び種々のリボソーム形成の影響を詳細に述べるものである。また、塩度含量における脂質抽出の影響およびフィルタージ径の選択がまた提供される。

実験例2

フィルタージ径の選択

この実用例は、ユニラメラリボソームの製造におけるフィルター孔径の選択、特に約100nmより小さい等しい孔径を有するフィルターを用いての脂質を示すものである。

EPC LUVが実験例1に述べた製造法に従って調整され、そして次に100および200nmの孔径を有するポリカーボネイトフィルターを通して等速に通過させた。得られたリボソームのユニラメラ性は、上域の³¹P NMR法を用いて測定された。結果は第2図に示される。

この図に示すように、200nmフィルターを通過したベクトルに関しては、第1フィルターを5倍通過後に倍増は約45%に低下し、そしてその増減は一定を経た。一方、100nmフィルターのものに際しては、5倍ないしそれ以上の通過の後に倍増は約5%に低下した。

約50%への倍増増強に際する下限は、リボソームが実質的にユニラメラなものであることを示し、一方、わずかに5%への低下は実質的なラメラ性を示し、これらの結果は、100nmフィルターは実質的にユニラメラリボソームの製造において成功し、一方200nmフィルターは、

特異性61-502452 (14)

フィルターを通しての通過の阻害になかわりなくウルトラメウリボソムの顕著な阻害を製造することを増進するものである。

この相図は、図3(a)に示したフリーズフラクチャー断面観察面によって得られるものとされる。この図に示されるように、SPC、SPC-SPS(1:1)およびSPS-SPS(1:1)から100nmフィルタを用いて形成されたベクセル(それぞれ第3(a)図、第3(c)図)および第3(c)図は、得られたメラフの決定を示すものである。有孔状の構造を示さないもの(0、1%未満)を示すものであった。反折に、横断断面は、200nmフィルタを用いて製造されたSPCベクセルに面して容易に観察できるようにであった(第3(d)図)。

これらの結果は、本発明において、ユニラメラ性紙、1000nmあるいはそれ以下のオーダーの孔徑を有するフィルターの採用に価値あるものであることを明らかに示すものである。

实验例 3

1. リン酸塩、硫酸塩およびニッケル化合物

この実験結果、1000hフィルタを使用した場合に本発明の製法は、種々の原料成分に拘るしりよの比較的均質な床面の製造という現実性のある構築に替わることとを示すものである。ベンツル型壁および捕集器は、上部に述べた方法により製造された。試験結果下記の第4図および第

1. 表に示される。

第4層における褐色の柱状は、突角部1に鋭い結晶状のMILVを2つの(積重相)1000Å程度のフィルターを通して1回通過させることによって形成されたSPG。MILV Eに基いて計測されたベシクル直径を示すものである。第1層は、これに隣するおよび他の結晶相組成に関する非弾性平均自由エネルギー平均結晶サイズを反映形像に對して示すための指標である。

比較のために、BPC、LUVが、エミタメバシタが、
 1. 制御する方向に一時的に侵入し入り込んでいる2つの懸架
 2. 制御方向コンドの非透過性をより高い状態に、によって多
 3. 製され、そしてこのようにに浸透したよりLUVが2つの
 4. 「橋架」100nm孔徑フィルターを通して10個層に透
 5. 入る。ミンス、バビ、チャー、ダンビイ、ジャー、ノ
 6. ウイ、タフ、フォード、シタ、およびレミリス、
 7. エイ、エ、(1994年) バイオメカニクス、28: 83
 8. ~ 249 [Hins, E. E., Zandighi, G., Hozaki, Y., Tah
 9. ed, G., and Rappaport, J. A. (1991). Biomechanics
 10. 28: 830-840] およびミンス、エフ、およびババシヨブ
 11. ス、チャー、(1980) アプレ バイオメカニクス、
 12. 267- 508 [Szolai, F. and Rappaport-Javouin, E. (198
 13. 0). Appl. Phys., 20: 467- 508] を参照のこと。
 14. はこの比較対照の標準または標準1番に示される。(オク
 15. トラの比較対照の標準はオクトラシタール(1:0)

5) ようなるベンチルを形成するために用いられた固色、マルチメラベンチルが形成され、一方、本発明の製造法より同様の固色成分では、実質的にユニメラなベンチルが形成されたことが本発明の一般性に對して注意することは興味深いことである。

系の中に承れるベクトル直交基底を、1ノリ単位分子
 系との関係、例えば、 $\sigma_{\text{H}}^{\text{H}}$ (シェーン)、エレン、
 ルーデルフ、エス、フエンケルライテン、エム、エコー
 シン、ビーおよびウィグマン、フー、(1976年)
イオナシキナ エド ババフィカ アク、(1976): 137
 ~ 152 (Schöen, H., Redolp, S., Finkelstein, S.,
 Cohen, P. and Meistrich, B. (1976) Bischof, Biophys
U. Acta, 454: 137 ~ 152) を参照のこと。)、とエ
 ンゲル、列矢第4部(1970)クロック、ゼイ、(1982
 年) イオナシキナ エド ババフィカ アク、(1976):
 167 ~ 197 (Blaurow, A. & (1982) Bischof, Biophys
U. Acta, 650: 167 ~ 197) を参照のこと。)、および
 ベクトルが二ノリ単位を二に定数化することによって
 定数化に要するものの内側一ノリ単位別の値となる
 理由を決定するために用いるものである。これらの
 決定は、まず二ノリ単位ベクトルの割合を決定す
 るために、次に実験的に観察された相違を最もよび内側
 二ノリ単位割合と比較することになる。

第4図半に示される(調色)ペンタクルレイス分解に関する

あるこのアホな子に誘う。このようなバカには「果てしなく」
「ラマでやる場合には、最初の半信半疑の約43%の「
「ラマでやる」行動計画（M=2）の増加値を有しているの
「うな」といふ程度で推移が約1、 $0.81 \div 0.01$ であろうと
とが決定された。これは、狂ったほどに仮定の仮説を考慮し
て、1年間に1、 $0.81 \div 0.01$ の増加値の約43%と見做され
される仮定を更に極めて大に増加を有することの
1年間に1、 $0.81 \div 0.01$ の増加値の約43%と見做され
て、増加された1年間に1、 $0.81 \div 0.01$ の増加値の約43%と見
られるのである。

1. 5 MJ/m^2 の照射強度を第1機に示す実験的データと比較して、SPCおよびEPCより組成されるUVIETが照射されたものより小さな減感量を示すこと、一方、ホスファチルセリンなどのような帯電性物質が存在していると、電荷の蓄積密度が逆転されることが示される。

EPCおよびSPC-LUVE-Tに於いて観察される低引張強さに関する2つの可能性のある理由は、構造中に存在する過剰な量のマルチメラバシクルがあること、あるいはまたフリースラックチャー-網鎖間と界面から生じたものよりスモールバシクルの存在するより大きな割合があることである。フリースラックチャーの形成は、観察されたマルチメラバシクルのわずかな%が核形成を示すもので

特表昭 61-502452 (16)

寒能集 G

1.0000より小さな乱数を出すフールターの法

この定価別には、製造されるリボソムのサイズにおけるゆび実質的にユニラメラ性を生ずるために必要とされるフィルタを透過しての海苔の開放における1000倍より小さな孔を有するフィルターの使用の効果を示すものである。

MALYALAM語を10000語の語彙で得てきた1500 NMRスペクトルより2000個ほどの標識(47)を、を用いて3名所の1)標識を抽出した。この介添剤は、1)主成分の濃度を用いて、5.00ppmまたは3.00ppmの濃度を有する2つ濃度の異なるポリマー溶液にフルオアを添加して1)濃度を定めた。此標識を添えて1)の透過度の異なる10個濃度の炭化水素溶液に付した。上述したようなフルオアフラクチャー装置後部を存在するために付した。炭化(1)または2)の濃度の標識、4)を付した透過度の異なる炭化の炭に付した。上述したようなMPLCを用いて³¹P NMRにより分析された。炭化は炭7-10個に炭化する。

図 7 に示すように、500nm フィルターを通して一度抽出されたベシクルは 40% の増加において 31% NMR 信号の 3.7 パーセントを失ない、一方 500nm フィルターを通して一度抽出されたベシクルは 4.7、5 パーセントを失なう。これは、500nm フィルターを通過したベシクルは

に關して實際的にユニラメラなりポーズの範圍を越する
ために要求される。

要應機？

ムニラキオリボソームの生体内分布

この実験例は、本実験に従って調製されたリポソームの、
内包された [get tagged] 物質の生体内分佈 [in vivo]
調査への応用を暗示するものである。特に、上述の実験例
1 に従い調製された ¹²⁵I - テラミルノ - イヌリン (¹²⁵
[T]) を含み、¹²⁵I の脱与およびその後の生体内分佈
を調べることに似し観察するものである。

テラニル・イスリン®がよいにして開発された。イスリン(1、0g)が錠剤で0、06mgに溶解され、そして4日に与えられ、1、0ml毎時10℃(新製)が錠剤化され、さらに炭酸塩緩衝液中で4ヶ月より15分目まで安定した。造りかたは特許出願中。イスリン[®]と水当りの割合を示す比と溶解性および安定性は【表A】、ジェイ、J. マックス (オバ バイオケミカル アナリシス、ピー、グリアック(編)第3巻、第11頁、インターサイエンス(1958年))と(Pyer, J., Abstracts of Biochemical Analysis, P. Allick (Ed.), Vol. 3, p. 111, Interscience (1958))を参照せよ。 参考文献①(1)；、および中において我々が報告し、造りかたは前記の製造法とほぼ同じである。5%の炭酸塩NaHCO₃・P.O.₄、4、3gの水によりテラニル、0、5gのホウ素とし、

している場合には、特にそうである。

本発明に関連して、全々のプロセスは、シリコンを溶解するために用いられる溶剤の腐蝕性を低く抑えることによって、製造されたペタクルの比較的低の腐蝕密度にもかわらず、3日間のオーダーの製造効率を有するようになされるものである。

この新薬は、LリゾTEMに抽出された米胚芽油のパーセンテージが、実施例1の製法に従って調整されたLリゾTEM（脂肪）および実施例4の凍結-解凍法を用いて製製されたLリゾTEM（白濁）に換える割合に応じて調整されている。製法図において示されている。

300 g ml⁻¹ / 滅菌貯留液での L₁ ET の繁殖倍、この図に示されるように 30% のオーダーの増殖率を示すの上児を育て、母液に添加される。凍結-解凍サイクルが 300 g ml⁻¹ / 滅菌低い貯留液で、固着が 100% 均一の増殖量に及ぶのを観察し、むしろに於けるものであることに注意することは極めて重要である。同様の現象が、ピット、ユー、1981年）アム、バウム、バィオフィス、242: 100~194 (Pick, U. 1981) Arch Biochem. Biophys., 212: 186~196] により報告されている。

3DnFアルターを遊して過酷したのよりも大穴がいやばい。まあほやまりマルマルなものであることを示すものであつた。この状況は過酷さの面から90期に示されるフリーズラフチャー一戦は誤算容認によって難がなものとされる。これらの面との部分（第8A面より第9期）を比較するところには、5DnFアルターを遊して一戦過酷されたらボソーンが、3DnFアルターを遊して一度過酷されたのよりも穴がまた不足しているものであることを示すものである。

1) 4回油通の表、5) 6回および3) 6回フィルターに関して、²¹⁰Pb、²¹⁴Pb及び²¹⁴Bi核種それぞれ5.3および5.6パーセントまで下降した。これは、東方のフィリピンが本質的に閉じこめタイプのリボソムを製造していることを示すものである。これは東部の集団が4.4 ± 1.4 aBの平均経歴、すなわちリボソムの製造経歴を有することを示しているフリーズ・ブラッザーの調査結果と東部の分類により着目したものとなれた。第3巻第8および第9図面によって示されるように、それぞれの場合において、観測された集団は均質なものであ

第7図の結果を第2欄における1000Åフィルターの露光と比較すること、³¹⁾ NMR磁場は、より小さな孔径を有するフィルターに対してより早く水平なものとなり得ることを表わすものである。従って、射出装置を通してのより少ない透過が、より小さな孔径のフィルター

特許略 91-502452 (17)

が、 $Q.M.H.C.H$ を得て7、5へと調整された。続いて、 $N.H.S.H$ 、 $C.N$ (0、25%)が添加され、そして溶液は最後に4時間攪拌された。残存するアルデヒド基は、 $N.H.S.H$ 、0、2%の塩基性添加により還元され、そして研究室は、27°Cでさらに1時間攪拌された。最終濃度(2.5%)が、減圧下に蒸留され、 $N.H.S.H$ で平衡化された。5×80mmのセファテックスR-25カラムに4度でかけられた。流速は1.0ml/分毎に調整され、面分4mlが得られた。この部分は、27.3mlでの吸光度を記録することによりグラミンに類似して測定された。アントロン検量装置(ロー、タレイ、エイチ、(1965) *ジエロ、イスク、ケル*、812: 335-343; (1966) *イ、エ、エ*、812: 335-343)を参照のこと。)を用いて順に測定して検定された。割合面分は、密度番号 [444 Vol%] 中に溶解し、そして0、5の一定グラミン! イズリンを含有するものであった。最終添加物セファテックスR-25カラムにおける高クロマトグラフィーにより測定して、塩基性アミンおよびその塩の割合に完全に分離されていた。ピーク成分はイズリンに落着き80%の収率をなして表出された。

セラムニル・イズリン付加物は以下のようにして調製された。セラムニル・イズリン付加物2、5%は0、2mlのヘプス(2.0%)、 $N.H.C.H$ (1.45M)で7、4ヘプスに溶解し、ヘプス中に溶解され、そしてア

イオダン4.0%が予め $C.H.C.H$ 、3.0%から新出された、1、5%検量液中へ入れられた。次にキャリアーフリー $N.H$ ¹²⁵ [4.0%、3.0%ml/分]が添加され、そして溶液が蒸留で45分間蒸された。溶液が次に1.0%の0、1M $N.H.S.H$ 、0.0、0.5M $K.I$ を含む溶液に移され、そして次に $H.B.S$ で平衡化された。2.5カラム(1×2.0%)へかけられた。割合(0、5%)が定められ、そして空白溶液(2、5%)中に溶解する¹²⁵ [含有部分は、アルコールと、得られセラムニル・イズリン(¹²⁵ T)] 溶液は、1.0ml/分 ¹²⁵ [をまわって含み、その0、0.1%未満は蒸留カラムの形状(0、0.1%未満は、1、2%)、0、および0、4% $K.I$ に形成した場合に追加可能である。)でありそして99%以上の割合はセファテックスR-25を用いる高クロマトグラフィーにおける空白溶液中の1つのピークとして分離されるものであった。すべての研究において、濃縮物は2.5%濃度内に用いられた。

¹²⁵ [を蒸留したリソームは、上記に述べたような装置を用いて調製された。昇降には、低セラムニル・イズリン(EP C) 3.0%およびコレステロール3.0%の $C.H.C.H$ 。から調製された。得られた物質フィルムは¹²⁵ [T] 1.0%を含有 $H.B.S$ 1ml中に高濃度混合により分離された。このようにして製造されたセラムニル系は次に $N.H$ (2.0%→4.0%)下に2分間攪拌され

ポリカーボネートスクレガフィルター(1.0mm孔径)を通して1.0ml蒸出された。L.U.V.E.Tの部分係率(0、1%)は予め $H.B.S$ で平衡化されたワルトログラム3.4カラム(1ml)にかけられた。流動含有部分、アルコール、そして高クロマトグラフィーは、¹²⁵ [T]の97%より多くがセラム中に「蒸留」されていることを示した。得られたリソーム添加物、蒸留リン酸エステル分析および結算された¹²⁵ [T]から蒸出して0、9ml/分 $N.H$ リン酸の濃度を測定していたイスク、ター、エイチ、ヒサバロフ、ワイ、(1975) *ジエロ、イスク、ケル*、83: 375-379; *Nishio, C.I. and Shubert, Y.* (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 875-879)を参照のこと。これらのセラムの平均分子量は7.0kDであった。¹²⁵ [T]を含有するL.U.V.E.Tは $H.B.S$ 2.0%中にあり、0、5ml/分リン酸と希釈され、4度で保存されそして製造の2日以内に使用された。

このL.U.V.E.Tが、実験および蒸留前中に溶液に添加採取された毒性ウィスター (Rhesus) ラットに、エーテルを用いて血液にからく血液をし、そして次に蒸留液を介してL.U.V.E.T (0、5.0%リン酸)中に内包された約0、5μCiの¹²⁵ [T] Iを含有する2.0% $H.B.S$ を注射することによって注射された。ラットは翌日より貴種が集められる代謝カラムに提供された。注射後約4時間の間に、ラットはエーテルで麻酔をかけられ、そして

大腸からの断面により検定された。最終は、2.0% $N.H.C.H$ 2.0%中に含むセラム中に蒸留され、そして蒸留液は、4、9%濃度/1.0%ラットを蒸出して約95%であった。心臓、肝臓、脾、肺臓および腎臓は除去されそして凍結中に残っている塩が融けられた。尿は次に7.0%で $N.H$ $N.H.C.H$ 2.0%中に溶解された。液体相の分析は分析物および濃度の試験に¹²⁵ [T]の存在に類似して検定された。

第10日はL.U.V.E.Tの濃度からのクリアランスおよびその後の尿中のイズリンの排出を調べるものである。この日に示されるように、両事における内包された物質は蒸留されたレベルの約40%に濃度中に減少され、そしてその後は、非常に高い半減期(約3時間)を有して衰えていく。さらに、注射された物質量の約25%は、3日後においても尿中に最終的に排出される。この低濃度の結果は、¹²⁵ [T]を内包したL.U.V.E.Tの組織採取および結果を明らかに示すものであった。

尿量の相対分析は第1日に示され、ここにおいて、液体内¹²⁵ [T]の約50%が尿によって排泄され、約10%が排泄によって、そして残りの割合中に残っていることが示されている。3年後の¹²⁵ [T]が注射後の注射の時間において、心臓、脾および腎臓中に内包された(データは未表示)。尿は、検定された低濃度分析は、他の方法によって製造されたリ

特発昭61-502452 (19)

されたりボソムのサイズ分布は、第2峰に偏される。この場合、2次多分散性がデータに適合しないものであったことを意味するものと考え、 X^2 が算出され、そしてそれゆえリボソムの分散係数は第一モードのガウス分布を有していないものである。

この結果を光散列の結果と比較することで、一定孔径のフィルターを通してのリボソムの凝集状態は、凝集のタイプのリボソムの所蔵する孔径の一定のフィルターを通しての通過により製造されたものとは違いく異なるサイズ分布を有すべきことに転出するものであることが容易に図解される。

本発明の特定の実施態様を述べた例示してきたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく変更がなされ得ることが理解されるべきである。例えば、本発明は、本発明中に開示されたもの以外の種々の凝集状態および均質凝集物質を用いて実施されることが可能である。同様に、本明細書中に開示した以外の種々の装置が本発明を実施するために用いられることができる。特に、その凝集のそれとそれとが非常に制御可能であるゆえ、本発明の方法は特に完全に自動化された方法への移行に迫るものであり、そしてこのような移動は本発明の範囲内に特に包含されるものである。これらの凝集を製造に当たって、他のタイプの原料が、適当な凝集状態を得るために用いられることができ、そしてその他の旋光的アプローチが、既記範囲内が許す

方法より生成されるタイプのものであるか否かを決定するために用いられ得る。添付された請求の範囲内に定義された本発明の範囲は、これらのおよびその他の変態態様を含むべきことを意図するものである。

図17 図18

1.0 Qの孔径を有するフィルターを通しての組の

凝集状態の抽出により製造されたベシクルの凝集状態

原料	孔径*	平均直径 ¹⁾	平均分散係数 ²⁾
	30	標準偏差 (nm)	標準偏差 (nm/μm)
GPC	30	71±24	1.1± 0.1 (64)
SPC	40	70±23	1.2± 0.2 (18)
GPC/SPS(2:1)	40	73±23	1.5 (2)
GPC/SPS(2:1)	固定せず	73±20	2.4 (2)
GPC/SPS(2:1)	固定せず	79±38	2.0 (2)
SPS	固定せず	固定せず	2.3 (2)
SPS	固定せず	固定せず	2.2 (2)
GPC(凝集状態)	51	72±10	2.2± 0.5 (17)
SPC(凝集状態)	51	84±20	2.2± 0.1 (12)
GPC	40	固定せず	1.2± 0.1 (3)
GPC(凝集状態)	50	固定せず	1.2 (2)

* 5 nm Nu^{21} の存在において検出される³¹P - NMR信号の強度。** $\mu m/1$ リン酸糖 (凝集内実測の長)

図19 図20

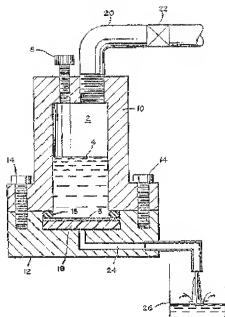
異なる孔径により製造されたリボソムの凝集状態

	一重孔径	多重する孔径
平均直径 (nm)	160	630
X^2	1.42	3.68
標準偏差 (nm)	55	**
標準偏差 (nm/μm)	10	10

* 平均直径、 X^2 および標準偏差に关する値は、ニコン モデル 200 レーザ パーティクル サイズ (ニコンパインストルメンツ、インコーポレーテッド、サンタバーバラ、カリフォルニア州 93111) を用いて測定された。次の入力パラメータが用いられた: 温度=10°C; 塩度=1.032センチボイズ; 屈折率=1.330; レーザ強度= 532 nm; および角度の1/2 の正値= 0.7070。参照のいづれのものに親しても、装置は固定ベースラインモードで用いられた。一重孔径の計算 (実施例9) に関しては、 0.08×10^6 の能力カウント値を生じ、 6.33×10^6 5500のランタイムが用いられ、 1.36 デュイを有する自己増殖数を生ずる。20000 cのチャンネル幅が用いられた差算する孔径の計算 (実施例10) に関しては、 8.01×10^6 の能力カウント値を生ずる、 0.68×10^6 5500のランタイムが用いられ、また 1.65 デュイを有する自己増殖数を生ずる、100000 cのチャンネル幅が用いられた。

** X^2 に関しては検出が可能な限り (実験誤差のこと)。

FIG. 1A.



特表昭61-502452 (20)

FIG. 1B.

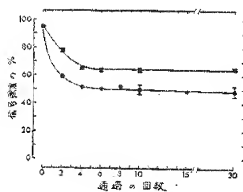
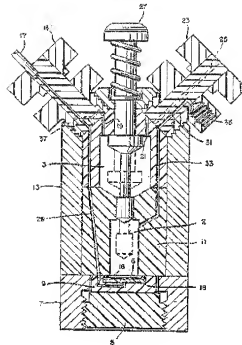
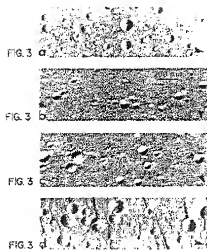


FIG. 2



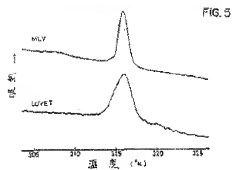
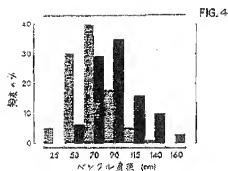


FIG. 9 a

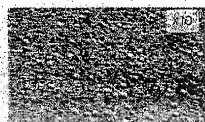
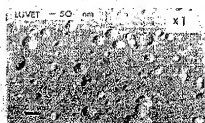


FIG. 9 b

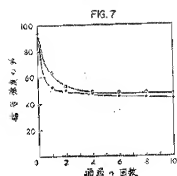
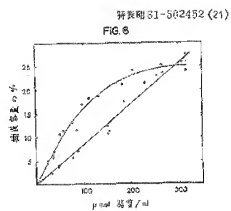


FIG. 9 a

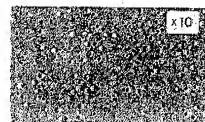


FIG. 9 b

F

特表昭51-502452 (23)

第1頁の続き

図式格主張

©1964年5月20日④米国(US)④DC2299

④註 明 者

ホープ、マイケル ジェイ

カナダ国 ブリチッシュ コロンビア プイ6アール 2ケイ

2、バンクーバー、ウエスト イレブンス アベニュー 3559

④発 明 者

バリー、マルセル ピー

カナダ国 ブリチッシュ コロンビア プイ6タイー 1エム

8、バンクーバー、コルベツト クレセント 5516